

研究課題名	免疫抑制型オリゴ DNA を有効成分とする食物アレルギー予防素材の創製研究
フリガナ	シモサト タケン
代表者名	下里 剛士
所属機関（機関名） （役職名）	信州大学 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	乳酸菌オリゴ DNA 含有飼料の自由摂取による気管支喘息の抑制効果 日本畜産学会第 122 回大会, 2017 年 3 月 28 日

研究結果要約

オリゴ DNA は、化学合成された DNA 短鎖であり、含まれる塩基配列により多彩な免疫機能を発揮する機能性核酸素材である。研究代表者らの研究グループでは、オリゴ DNA をカルシウム性ナノ粒子に包摂することで、胃液に分解されず腸まで届く DNA ナノカプセル (DNanocap) の開発に成功した。さらにアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた DNanocap の強制経口投与試験において、皮膚炎の発症を予防することを発見した。そこで本研究では、免疫抑制型オリゴ DNA を有効成分とする食物アレルギーの予防・軽減素材の開発研究を行った。はじめに、DNanocap をマウス用飼料に混合した特別飼料を調製した。さらに、食物アレルギーを用いたアレルギーモデルマウスを作出し、DNanocap 特別飼料の自由摂取による免疫調節作用について検証した。アレルギーモデルマウスにおいて、DNanocap 特別飼料の自由摂取により、アレルギー反応の指標が有意に減少した。すなわち、DNanocap を通常飼料に配合した特別飼料の自由摂取は、全身性の免疫調節機能を発揮することが示された。現在、DNanocap 含有量、投与期間を含む条件の最適化についての検証を進めている。

研究目的

日本の食物アレルギー患者の多くは、小児（15歳以下）、とくに離乳食開始直後の乳児に多く、約10人にひとりが発症していると言われている。乳児の消化器系は、未発達であることから食物成分を十分に消化することが出来ない。その結果、未消化のタンパク質が抗原性を有したまま消化器粘膜より吸収され、アレルギー症状を発症することがある。現在の医療現場では、パッチテストや血液検査によって原因食材を推定し、その食材を極力摂取しないよう指導する“アレルゲン除去療法”が主流である。また、発症してしまった場合には、対症療法としてステロイド剤が投与されるが、副作用の問題が取り沙汰されている。食品衛生法に基づき、平成13年より加工食品のアレルギー表示制度が定められ、パッケージ化された加工食品には注意が払われるようになった。しかし、テイクアウト販売やスーパー店内で調理された惣菜類などは、表示法の対象外となっている。2012年12月には、重度の牛乳アレルギーをもつ小学生が、チーズ入りの給食を食べた直後に体調を崩し、搬送先の病院で死亡するという悲しい事件も起きている。たとえ患者本人が危険な食材を把握していても、実社会における食生活を送る上で、それらを口にするリスクは至る所に存在している。食物アレルギーを巡るこれらの問題を踏まえ、私は、食物アレルギー発症のリスクを未然に防ぐ“食べる”機能性素材を開発したいと考えた。2015年、私の主宰する研究グループでは、強力な免疫抑制作用を有するオリゴDNA（DNAの断片）のナノカプセル体（DNanocap）の開発に成功している。そこで本研究では、DNanocapの食品添加に向けた基盤を構築する目的で、DNanocap特別配合飼料を試作し、同飼料の自由摂取による、アレルギーの予防効果について検証することを目的とした。

研究計画及び研究手法

1. オリゴDNAの合成

オリゴDNAの合成は株式会社ジーンデザイン社に合成を外注委託した。本研究で用いたオリゴDNAの塩基配列を以下に記す。Phosphorothioate (PS) bond ODNを合成した。

Class B CpG ODN, MsST, 5'-C*A*G*G*A*C*G*T*T*G*T*A*T*C*A*C*T*G*A*A-3'

inhibitory ODN (iODN), iSG3, 5'-C*C*T*C*A*T*T*A*G*G*G*T*G*A*G*G*G-3'

*はPS bondを示す。

2. DNanocapの合成

オリゴDNA-炭酸アパタイト粒子複合体（DNAナノカプセル, DNanocap）の合成は、Wangら（Mol Ther 23, 297-309, 2015）、およびYamamotoら（Sci Rep 5, 7742, 2015）の方法を一部改変して行った。ナノサイズのカルシウム粒子にオリゴDNAを吸着させ、マイクロサイズにまで成長させた上

で、凍結乾燥して保存した。また、当初の計画通りに、研究計画を遂行した。

3. アレルギーモデルマウスの作出と DNA ナノカプセルの経口投与試験

当初、激しいアレルギー反応として知られるアナフィラキシーショックモデルマウスを使用する実験を計画した。アナフィラキシーショックモデルマウス (N=3/群) で行った予備試験の結果、アナフィラキシーショック反応を DNanocap の経口投与で制御するためには、多量のオリゴ DNA を要することが明らかとなった。そこで、比較的マイルドなアレルギーモデルとして知られる気管支喘息モデルマウスを用いて、以下の計画を実行した。BALB/c (4 週齢, ♂) マウスを予備飼育後、実験群として①NT 群(アレルゲン感作無し, non-treated (NT) 群)、②NF 群(アレルゲン感作有り, normal-feed (NF) 群)、③DF 群(アレルゲン感作有り, DNanocap-feed (DF) 群)の 3 群に設定した。DF は、マウス 1 匹あたり DNanocap 1mg/マウス飼料 3g/day で調製し、70 日間自由摂取させた。喘息モデルマウスは、OVA を水酸化アルミニウムゲルとともに、42、49、56 日目に腹腔内投与し、63~69 日目にネブライザーを用いてエアロゾル化した 2% OVA を閉鎖環境下で 30 分間吸入させることで作出した。70 日目にマウスを安楽死させ、気管支肺胞洗浄液(BALF)、血液、肺および脾臓を採取した。

4. 免疫反応の測定

各種細胞は遠心分離 (400 x g, 20°C, 5min) し、RPMI-1640 培地に 10% fetal calf serum、100U/mL penicillin、100mg/mL streptomycin、25mM HEPES、1.0mM sodium pyruvate、nonessential amino acid、0.0035% 2-mercaptoethanol を加えたコンプリート培地に懸濁した。細胞固定液 (4% paraformaldehyde, PFA) を用い、室温で 15min 静置することによって細胞を固定した。固定後、100 μ L に分注し、 1×10^6 cells/tube に細胞調製後、蛍光標識した抗体を用いて染色した。細胞を抗体希釈液 200 μ L に懸濁後、FACS 用チューブ (BD) に移し、FACS Calibur HG (BD) で取り込み解析を行った。すべてのデータ解析は Flow Jo ソフトウェアを用いて行った。

5. 統計処理

結果は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, one way-ANOVA) で解析後、多重比較検定 (Tukey-Kramer 法) により統計学的有意差を検出した。有意水準 (α) は、0.05 を採用した。

結果と考察

細菌のゲノム DNA には、哺乳類のゲノム DNA と比較して約 20 倍にも及ぶ多くの非メチル化 CpG モチーフが存在する。近年、乳酸菌やビフィズス菌をはじめとする有用微生物由来の DNA 配列に基づき化学合成された、非メチル化 CpG オリゴ DNA (CpG-ODN) は抗アレルギー、抗腫瘍や抗炎症性作用といった様々な機能性に関する研究が展開されてきた。実際にワクチンアジュバントとした免疫機能性 CpG ODN は、抗アレルギー薬、抗腫瘍薬として様々な臨床治験が行われており、その有効性が

証明されている。ODN の一般的な投与方法としては、腹腔内投与 (i. p.)、鼻腔に滴下、尾静脈からの静注投与 (i. v.) などの手法がよく使用されている。また CpG-ODN の投与量としては、マウス 1 匹あたり 100 μ g 以上といった報告が多い。残念ながら、CpG-ODN の経口投与により、腸管粘膜免疫を介する機能性に関する知見はほとんどない。

抗原の注射投与では、全身免疫には効果的に免疫応答が誘導されるが、粘膜免疫系には免疫応答が誘導されない。しかしながら、粘膜免疫システムを介した抗原の経口投与は、全身免疫応答の誘導のみならず、粘膜系にも免疫応答が誘導できる。さらに、注射投与に比べて簡単で、安全性および経済的にも優れている。しかし、免疫機能性を有する ODN は安定性が低く、経口的に摂取すると胃酸の影響により分解されるという弱点があるため、今まで腸管粘膜を介する経口投与例がほとんど無い。そこで、研究代表者らは、カルシウム性ナノ粒子キャリアーを用いた経口型耐酸性 ODN カプセルの開発研究を進め、胃液に溶けず腸まで届く DNA ナノカプセル (DNanocap) の開発に成功した。さらに本年、DNanocap の経口投与によりマウスにおけるアトピー性皮膚炎を抑制することを報告した^{1, 2)}。すなわち、DNanocap は消化管を介して腸管まで届けることにより、免疫機能性を発揮すると考えられている。そこで本研究では、DNanocap の経口投与による、食物アレルギーの予防効果について検証した。とくに、経口摂取可能な DNanocap の利点に着目し、「食品添加物としての利用」を目指した新たな試みとして DNanocap 特別配合飼料を試作し、アレルギーモデルマウスによる自由摂取試験を行った。

本試験では NT 群 (無処理群)、NF 群 (通常飼料群) および DF 群 (DNanocap 特別配合飼料群) の 3 群を設定した。試験終了後、マウスより血液および気管支肺胞洗浄液を回収し、IgE 量、OVA 特異的 IgE 量、IgG2a 量について測定した。IgE は抗原侵入部位の所属のリンパ節に存在する形質細胞、炎症部位で胚中心由来の形質細胞で作られる。そして抗原がマスト細胞表面の IgE に結合するとヒスタミンが放出されアレルギーを引き起こす。IgE 媒介食物アレルギーは、I 型食物アレルギーとしても知られ、アレルギー特異的 IgE 抗体の存在を特徴とする。抗原 (アレルギー) 特異的 IgE の存在は、アレルギーの重大な危険因子であると考えられ、診断マーカーとしても役立つとされる。今回の DF 群では、NF 群と比較して、IgE および OVA 特異的 IgE 量が有意に減少した。この作用は、血清のみならず、気管支肺胞洗浄液においても観察された。すなわち、喘息モデルマウスにおいて、DF の自由摂取により、気管支洗浄液 (BALF)、血清および肺におけるアレルギー反応の指標が有意に減少した。IgE の存在は、そのアレルギーに対応するアレルギーの重大な危険因子であることから、アレルギーモデルマウスが DNanocap 特別配合飼料を摂取することで、アレルギーの改善傾向が示されるという所期の結果が達成された。

アレルギーとは多くの人では正常に寛容化される特異的な環境抗原への有害な免疫応答である。アレルギー発病の中心となるものは IL-4、IL-5 および IL-13 の産生、IgG1 および IgE へのアイソ

タイプスイッチングの B 細胞の補助の供給、そしてアレルゲンに再暴露された組織における好酸性炎症の統合（2 型応答）により特徴づけられている。とくにアレルギー患者では、Th2 免疫システムが過多であることが知られており、Th2 免疫系と対をなす Th1 免疫系を促進し、免疫バランスを調節することが極めて効果的であると言われている。そこで、Th1 免疫系のマーカーとして IgG_{2a} 量について測定した。その結果、DF 群では NF 群と比較して有意な増加が確認された。2013 年に Kulis らは、ピーナッツ感作マウスにおける Type B CpG ODN の投与は MCP-1、Th2 系サイトカイン産生抑制およびピーナッツ特異的 IgG_{2a}、IFN- γ 産生促進を通してアナフィラキシー症状を抑制することを報告している³⁾。近年、CpG ODN は、その強い Th1 系誘導作用が注目され、喘息などのアレルギー疾患などの炎症性疾患の軽減・予防作用を目的とした *in vivo* 試験が盛んに行われている。本研究では、ヨーグルトスターター菌として知られ、Th2 型サイトカインである IL-4 の発現を長期にわたり抑制する *Streptococcus thermophilus* 由来 Type B CpG ODN (MsST)^{4,5)} を用いた。さらに、注射に頼らない「食べる ODN (Edible ODN)」のアイデアを具現化した DNanocap を通常飼料に配合した特別飼料の自由摂取試験を行った。DNanocap は、ODN 発見者のクリンマン博士（米国国立癌研究所）より、Molecular Therapy 誌に掲載された解説記事の中で「ODN の経口投与により臨床的有効性が示されたら、免疫治療の費用、不便さは激減するだろう」⁶⁾ と紹介された新素材である。経口投与の利点とは、注射器を必要とせず、簡便・低コストで、治療のリスクや苦痛が少ないことである。本研究で確立された腸管送達系は、医薬分野のみならず、様々な機能性食品や家畜飼料の開発分野において有益な技術である。今後は、使用目的に応じて ODN を使い分け、DNA ナノカプセルの経口投与試験を進めていく予定である。本研究成果の将来性は、動物試験の結果如何にかかっており、DNA ナノカプセルが経口機能性素材として利用される日が訪れることに期待したい。

近年、腸管関連リンパ組織 (GALT) を主とした粘膜免疫学の発展により、粘膜免疫系の制御を目的とした経口型ワクチンの開発研究が盛んに行われている。粘膜免疫システムを介した抗原の経口投与は、粘膜局所のみならず、全身の免疫応答を誘導できる。さらに、注射投与に比べて簡単で、安全性および経済的にも優れている。しかし、ワクチンやアジュバント分子の、腸管粘膜上皮および免疫細胞における作用機序の解明と、腸管送達系の構築が課題となっている。DNA ナノカプセルを応用し、ODN が胃や腸管など消化管を介して安定的に腸管粘膜に届けられれば、様々な疾病の予防・軽減に寄与する機能性サプリメントなどの創製が期待できる。また、ヒト腸内に豊富に存在する乳酸菌やビフィズス菌など、プロバイオティクスに由来する ODN を用いれば、消費者意識に配慮した新素材として提案できる可能性が高い。本研究は、ODN の腸管送達系の構築により、農学分野から健康維持・増進のための新たなワクチンアジュバントや機能性食品・家畜飼料素材の創製を目指す基礎研究として位置づけられる。

■学会や論文発表等の予定

1. 乳酸菌オリゴDNA含有飼料の自由摂取による気管支喘息の抑制効果, 日本畜産学会第122回大会, 2017年3月28日(学会発表)
2. Allergy誌への論文投稿を予定している。The oligodeoxynucleotide nanocapsules prevents allergic asthma in free-feeding mice

今後の研究活動について

本研究の成果より、DNanocapを通常飼料に配合した特別飼料をマウスに自由摂取させることで、全身免疫系を制御できることが示された。本結果は、食品(サプリメント)、家畜飼料、ペットフードなど日常的な経口摂取にDNanocapを適用可能であることを示した極めて重要な知見である。本研究では、DNanocapのマウス用粉末飼料を用いたため、食べこぼしや糞尿汚染の問題が生じた。現在は、DNanocapを配合したゼリー状飼料やペレットタイプ飼料の開発を進めており、併せて動物試験を実施している。とくに、DNanocap含有量、投与期間を含む条件の最適化について検証を進めている。

参考文献

- 1) Wang Y, Yamamoto Y, Shigemori S, Watanabe T, Oshiro K, Wang X, Wang P, Sato T, Yonekura S, Tanaka S, Kitazawa H, Shimosato T. Inhibitory/suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis in mice. *Mol Ther*. 2015 Feb;23(2):297-309.
- 2) Klinman DM, Sato T, Shimosato T. Use of nanoparticles to deliver immunomodulatory oligonucleotides. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2016 Jul;8(4):631-7.
- 3) Kulis M, Gorentla B, Burks AW, Zhong XP. Type B CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 responses to peanut antigens: modulation of sensitization and utility in a truncated immunotherapy regimen in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2013 May;57(5):906-15.
- 4) Shimosato T, Fujimoto M, Tohno M, Sato T, Tateo M, Otani H, Kitazawa H. CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 26;394(1):81-6.
- 5) Shimosato T, Tohno M, Sato T, Nishimura J, Kawai Y, Saito T, Kitazawa H. Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus* lacZ. *Anim Sci J*. 2009 Oct;80(5):597-604.

- 6) Klinman DM. Therapeutic implications of orally delivered immunomodulatory oligonucleotides. Mol Ther. 2015 Feb;23(2):222-3.

以上

次ページ以降に添付図（図 1, 2, 3）あり

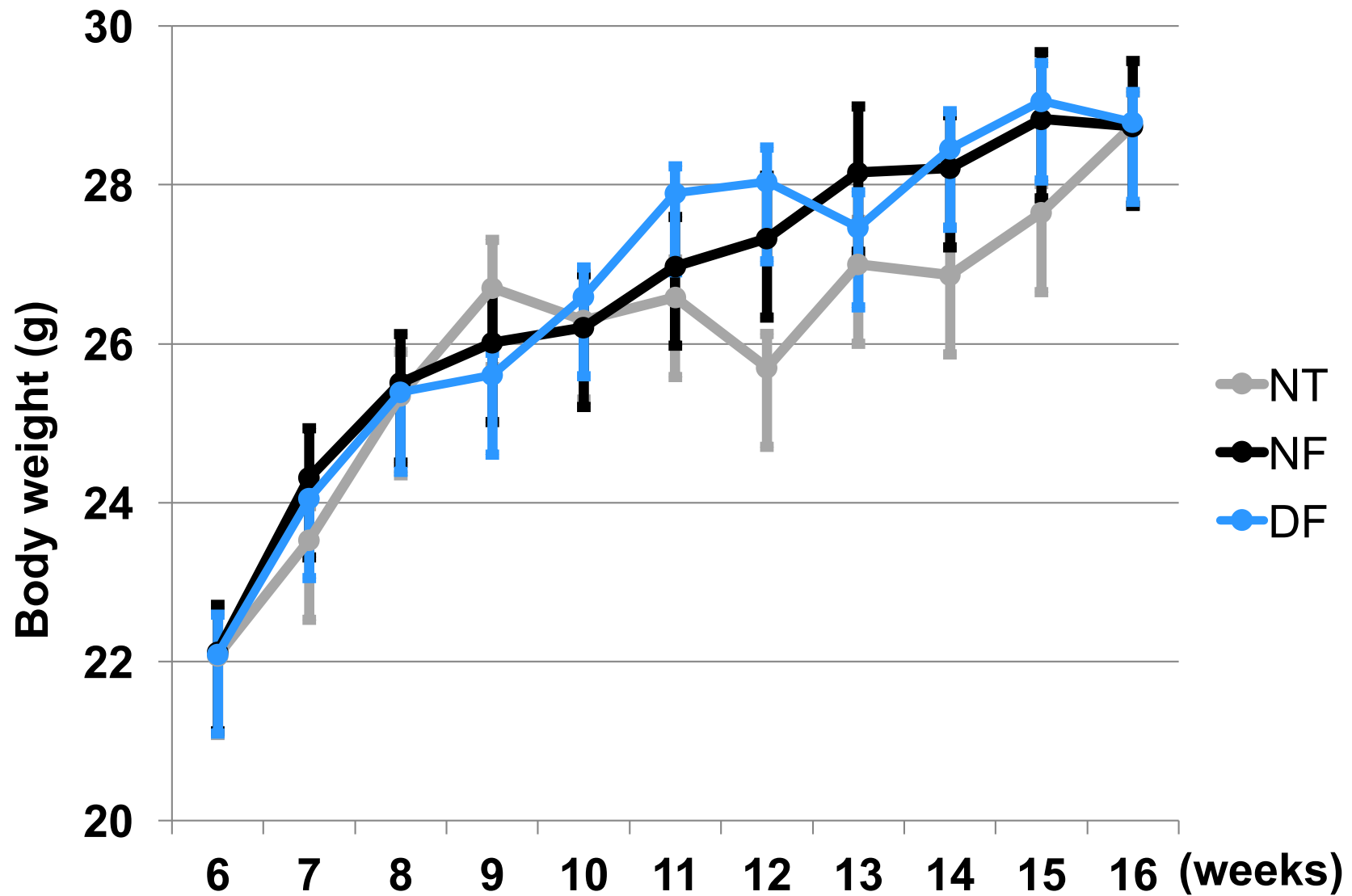


図1. DNanocap特別配合飼料の自由摂取がマウス重量 (mg) に及ぼす影響
各群間で有意差は認められなかった。NT:無処理群, NF:ノーマル飼料摂取群,
DF: DNanocap特別配合飼料群

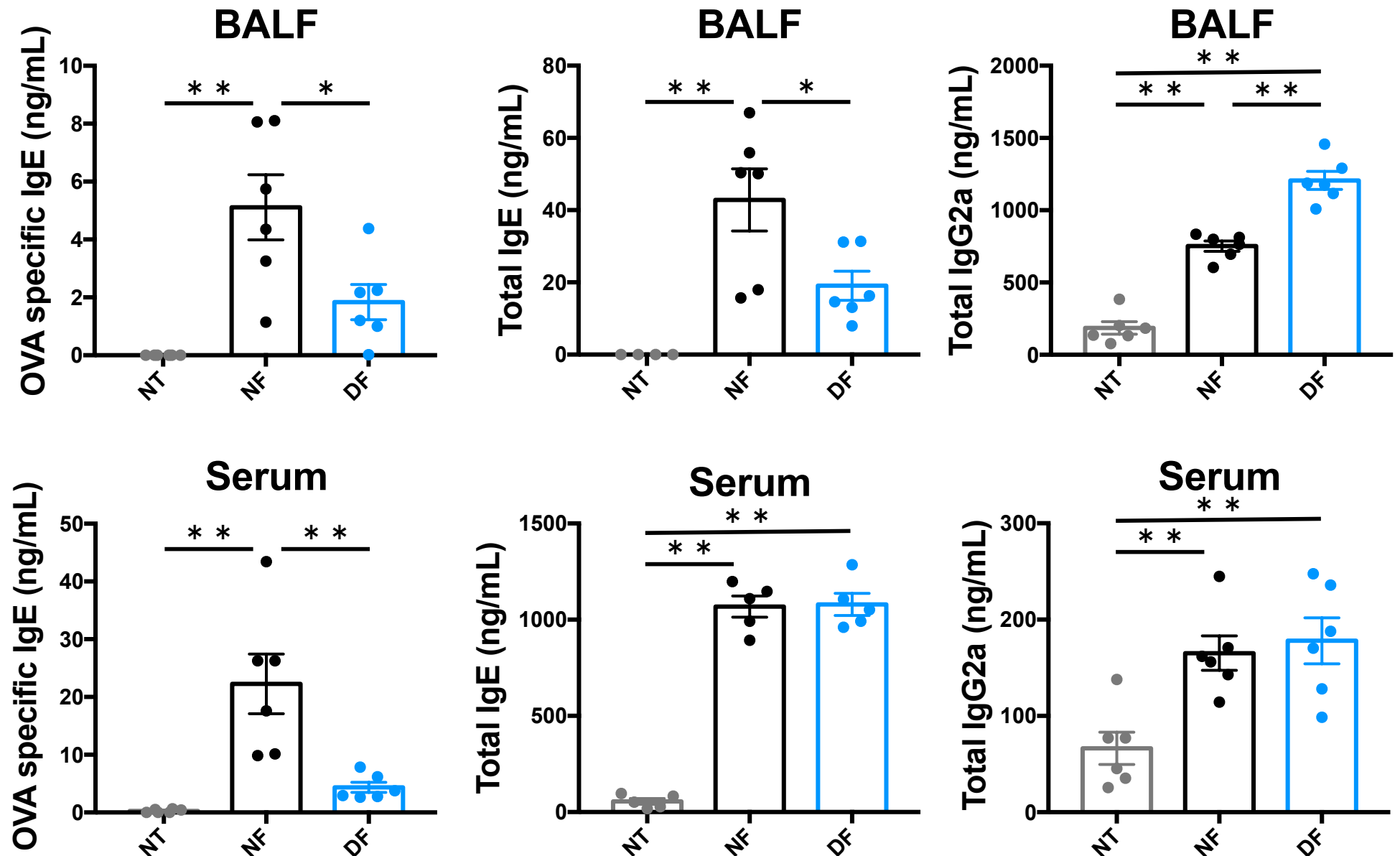


図2. DNanocap特別配合飼料の自由摂取による気管支肺胞洗浄液（BALF）および血清中（Serum）免疫グロブリン量に与える影響
 NT:無処理群, NF:ノーマル飼料摂取群, DF: DNanocap特別配合飼料群
 *p<0.05, **p<0.01

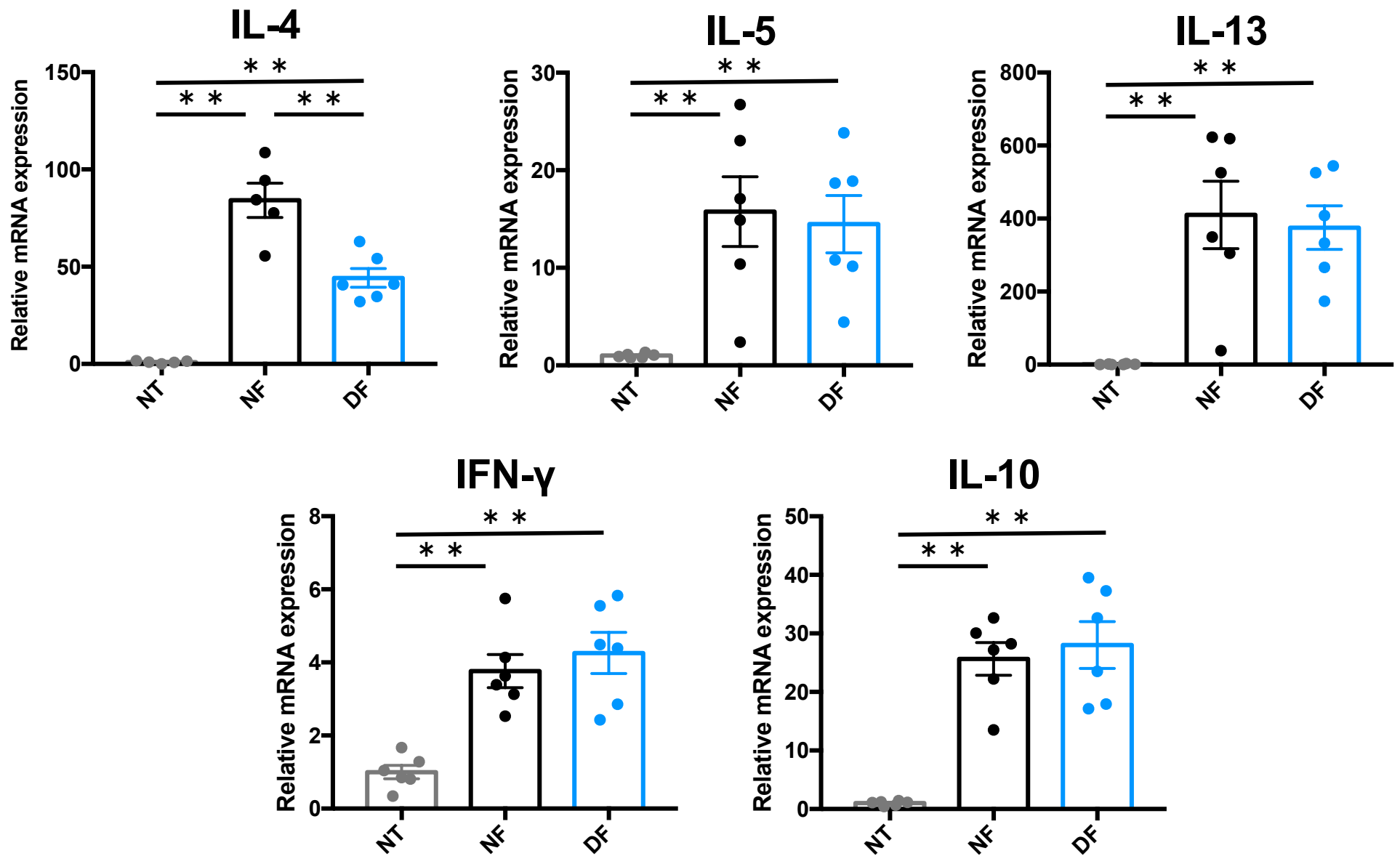


図3. DNanocap特別配合飼料の自由摂取によるサイトカイン産生量に与える影響
 NT:無処理群, NF:ノーマル飼料摂取群, DF: DNanocap特別配合飼料群
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$